

令和元年6月22日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10015

研究課題名(和文) 難治がん克服を目指したNKp44-キメラ型受容体と新規NK細胞増幅法の開発

研究課題名(英文) Development of Novel Immunotherapy of Cancer: NKp44-based Chimeric Antigen Receptors and Methods for Ex Vivo NK cell Expansion

研究代表者

今井 千速 (Imai, Chihaya)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：90419284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：難治がんに対する新たな免疫細胞療法の開発を目指して、NK細胞の体外増幅法および新規キメラ型抗原受容体(CAR)遺伝子について検討した。K562-mb15-41BBL細胞を用いたNK細胞の体外培養法は、各種の薬剤や放射線照射の工夫により増幅効率が変化した。NKp44受容体のリガンド結合部位を利用したCARを作成し、その構造改変と機能変化について詳細に検討した。第1世代CARにつづき第2世代CARの構造最適化を行った。この新規CAR遺伝子は、NK細胞あるいはT細胞に遺伝子導入することにより、表面に高発現し、白血病細胞や各種の固形がん細胞を認識し、サイトカインを放出し、細胞障害活性を発揮した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、難治性の急性リンパ性白血病およびリンパ腫に対するキメラ抗原受容体遺伝子導入T細胞(CAR-T)療法の目覚ましい成果が報告されている。CAR-T療法は急性骨髄性白血病や種々の固形腫瘍への応用が期待されているが、適切な標的抗原の選択が難しく、いまだに成功例はほとんどない。本研究では、体外増幅NK細胞療法から発展し、T細胞にNK細胞様の選択性を付与できるCAR遺伝子を作成した。B細胞性腫瘍以外の悪性腫瘍に対するCAR-T療法の開発においては、標的抗原ロスや免疫抑制的がん微小環境などの克服すべき問題点が多いが、NKp44-CARはその幅広い対象疾患から有力な候補となり得る。

研究成果の概要(英文)：We have developed novel chimeric antigen receptors (CAR) as well as a novel method for ex vivo natural killer cell (NK) expansion. We tried to optimize methodology to propagate NK cells with a feeder cell line, K562-mb15-41BBL, by changing several parameters, such as culture medium, E/T ratio, timing of irradiation, and additional drugs. We constructed a variety of CARs that utilize immunoglobulin domain of NKp44 receptor as an antigen-binding portion, which were tested for their surface expression and resulting functional diversities. Following completion of construction of 1st generation CAR, we also optimized the structure of 2nd generation 4-1BB-based NKp44-CAR. Primary human T cells or NK cells, transduced with NKp44-based CAR, are able to express the CAR protein on the cell surface, produce cytokines, and exert strong cytotoxic effects against a wide variety of leukemia cells and solid tumor cells.

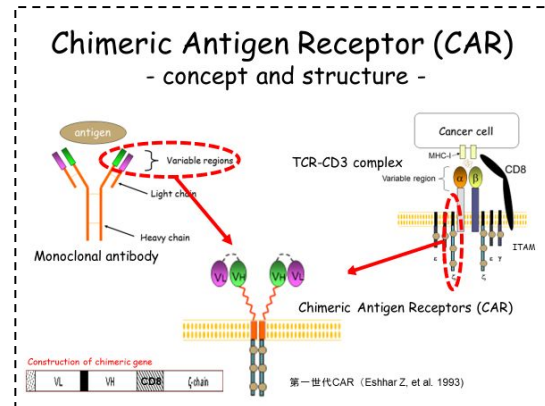
研究分野：小児血液学

キーワード：キメラ抗原受容体 NK細胞 CAR-T細胞 NK細胞受容体 NKp44 がん免疫療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

キメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor: CAR) は、モノクローナル抗体に由来する単鎖抗体を抗原認識に用いる人工的受容体である。本研究開始当初、すでに CD19 を標的とした CAR 遺伝子導入 T 細胞 (CAR-T 療法) が、難治性・再発性 B 細胞性白血病 (ALL, CLL) に対して劇的な効果を挙げることが報告されており、大きな注目を集めていた (Porter DL, et al. NEJM 2011; Grupp SA et al. NEJM 2013; Maude SL et al. NEJM 2014)。白血病における成功により、他の悪性腫瘍の治療にもこの治療法の導入が強く期待されたが、CAR の標的となるがん細胞特異的表面抗原は多くなく、かつ、その抗原に対するモノクローナル抗体 (ハイブリドマ) の存在が必須であることがハードルとなっていた。



NK 細胞は、事前の感作を要せずに腫瘍化細胞やウイルス感染細胞を認識し、活性化し、サイトカインを産生・放出し、殺傷する。NK 細胞活性化受容体群に認識される DNA ダメージ関連分子群は多様ながん細胞に発現し、その一方で正常組織に発現はないか、あってもわずかであると報告されている。これら分子群の受容体のリガンド結合部位を CAR の抗原認識部位として利用するアプローチの有用性が報告されている。例として、ストレスリガンドとして多くの腫瘍細胞に発現する MICA/B や ULBPs は、NK 細胞の活性化受容体である NKG2D に認識される。この NKG2D の細胞外ドメインをシグナル伝達分子と連結した Chimeric NKG2D-CAR が、T 細胞に NK 細胞様の活性を与えることが報告され (Zhang T et al. Blood 2005) 欧米で臨床試験まで進んでいる。元々生体に存在する免疫受容体/リガンドを CAR コンセプトに利用することは、特許権等により利用を阻まれるハイブリドマを使わずに開発が可能であるため、有用なアプローチと考えられる。しかしながら、NKG2D リガンドは種々の刺激 (サイトカイン等) により正常組織に誘導発現することが広く知られており、NKG2D-CAR-T 細胞は正常組織を攻撃する可能性が懸念される。実際に、NKG2D-CAR-T 細胞は、マウスモデルで死に至る重大な臓器合併症を生じたことが報告されている (VanSeggelen H, et al. Mol Ther 2015)。

NK 細胞は古くからがん治療への応用が目指されていたが、リンパ球分画の 5-15% と少数で、かつ体外培養が困難とされ、十分量の細胞数を得ることは困難であった。申請者が開発した K562-mb15-41BBL (米国特許 2008, 2011) は、ヒト NK 細胞の体外増幅の feeder cell line として有用であり、すでに本細胞による体外増幅 NK 細胞による臨床研究結果もドイツおよび米国から報告されている (Lapteva N, et al. Cytotherapy 2012)。K562-mb15-41BBL 活性化 NK 細胞は resting NK 細胞や IL-2 活性化 NK 細胞に比べてより強力な細胞障害活性を呈し、小児固形腫瘍では特にユーイング肉腫の感受性が良好である。一方、横紋筋肉腫、神経芽腫、骨肉腫の細胞株に対する細胞障害活性についてはやや劣る結果が報告されており (Cho D, et al. Clin Cancer Res 2009) 改善の余地が残っている。NK 細胞の細胞障害活性を向上させる方法として、ヒト primary NK 細胞に CD19-BBz-CAR を発現させることで、NK 耐性の腫瘍 (前駆 B 細胞性白血病) に対し強力な殺傷能を付与できることを申請者が初めて示した (Imai C, et al. Blood 2005)。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子改変免疫細胞 (T 細胞および NK 細胞) を用いた、難治性小児固形腫瘍 (神経芽腫や各種肉腫) に対する新たな細胞療法の実現に向けて、以下の点について基礎的検討を行った。

) : NKp44 受容体をベースにしたキメラ型受容体 (chimeric antigen receptor: CAR) のデザイン決定、T 細胞及び NK 細胞における機能評価

) : NKp30-CAR など、他の NK 関連受容体由来の新規 CAR を作成し、白血病や小児固形腫瘍に対する有効性につき NKp44-CAR と比較検討

) : NK 細胞体外増幅培養条件の改良

3. 研究の方法

) : NKp44-CAR の作成と機能評価: Wild-type NKp44 の PCR クローニングに引き続き、様々な構造の NKp44-CAR 遺伝子を SOE-PCR で作成した。Jurkat における発現確認を経て、数種類の NKp44-CAR について T 細胞における機能比較、NK 細胞における機能比較を行った。ヒト初代培養 T 細胞における機能評価では、ヒト primary T 細胞を IL-2 存在下 (200 単位/ml) で抗 CD3/抗 CD28 ビーズにより刺激し、レトロネクチン (Takara) 存在下に 48-72 時間後にレトロウイルス液に暴露することで CAR-T 細胞を作成した。NK 細胞への遺伝子導入では、K562-mb15-41BBL との共培養により NK 細胞を選択的に活性化増幅し、遺伝子導入に供した。() : 他の NK 関連受容体由来の新規 CAR の作成と比較: NKp30-CAR などを作成し、様々な由来の腫瘍細胞株において比較検討する。さらに、K562-mb15-41BBL 活性化 NK 細胞との

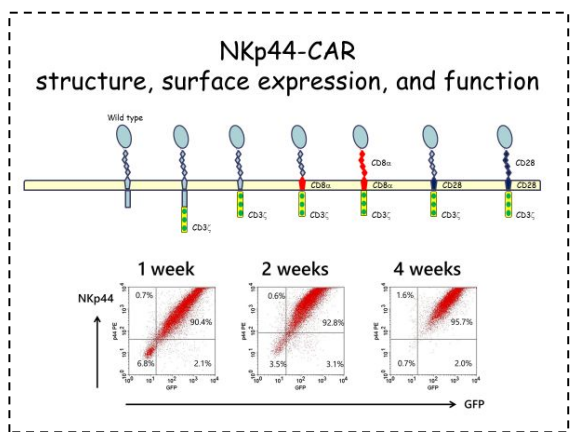
比較を行った。

) :NK 細胞体外増幅培養条件の改良と新規 feeder cell line の開発： 既存の Feeder cell line (K562-mb15-41BBL) を利用した培養条件の改良、 新規 Feeder cell line の開発に向けた候補因子の検討を行った。

4 . 研究成果

[1] NKp44-CAR の作成

培養ヒト活性化NK 細胞からNKp44 をPCR クローニングしMSCV-IRES-GFP ベクターに挿入した。NKp44IG-wtH(hinge)-wtTM(transmembrane)-wtIC(intracellular)-CD3z (Wild type-NKp44 直下にCD3z を挿入) NKp44IG-wtH-wtTM-CD3z(WT-NKp44-TM 直下にCD3z を挿入) NKp44IG-wtH-CD8aTM-CD3z (hinge region までは Wild type NKp44、それ以下にCD8aTM-CD3z を挿入) NKp44IG-CD8aH- CD8aTM-CD3z (NKp44 IG ドメインだけを用い、その下流はCD8aH-CD8aTM -CD3z を挿入) を作成した。さらにCD8 に代えてCD28 をHinge および TM を用いてNKp44IG-wtH-CD28TM-CD3z およびNKp44IG-CD28H-CD28TM-CD3z も作成した。コントロール受容体として、NKp44IG-wtH-CD8aTM (wild type TM 以下をCD8a TM に挿げ替え、かつシグナル伝達部位を欠損) あるいはNKp44IG-wtH-CD28TM も作成した。CD19-CAR のVL-VH ドメイン(抗原認識部位)は242個のアミノ酸で構成されるが、NKp44b IG ドメインは106個のアミノ酸で構成され、CAR の遺伝子サイズは400bp 以上も小さくなった(レトロウイルスによる遺伝子導入では有利)。



[2] NKp44-CAR の Jurkat 細胞における発現の確認

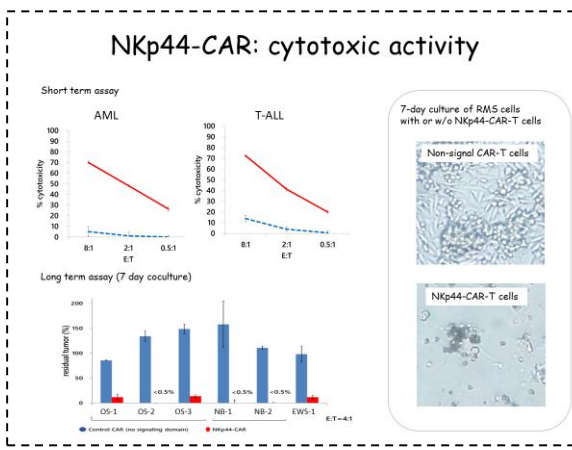
Jurkat (活性化などのT 細胞機能を残すT 細胞性白血病細胞株)にNKp44-CAR コンストラクトを遺伝子導入し、その発現パターンを確認した。Jurkat 自体がNKp44 リガンドを発現するため、これらのCAR を発現した細胞はAuto-stimulation もしくはTrans-stimulation を生じたため、遺伝子導入のみで活性化程度の定量評価(CD25 あるいはCD69 発現量)も可能だった。

[3] 腫瘍細胞でのリガンドの確認

各種腫瘍細胞株(急性骨髄性白血病、T 細胞型急性リンパ性白血病、前駆B 細胞型急性リンパ性白血病、骨肉腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、膠芽腫、子宮頸がん)におけるNKp44 リガンドの発現をフローサイトメーターで定量測定した。上記の細胞株ではすべて高発現が確認された。一方、正常リンパ球(休止期、活性化ともに)ではリガンドは認めなかった。

[4] NKp44-CAR のヒト primary T 細胞における機能評価

NKp44 はDAP12 と膜貫通ドメイン(wtTM)で結合するため、この部位が発現に必須である可能性がある一方で、DAP12 の発現量に規定されCAR 発現が抑制される可能性といずれも否定できないため、一通りの比較を行った。また、発現量はT 細胞とNK 細胞で異なる可能性があり、ヒト primary T 細胞およびNK 細胞に上記CAR を遺伝子導入し、両者でそれぞれ検討した。T 細胞、NK 細胞のいずれにおいても、高い効率で(70-90%) 遺伝子導入を達成できた。NKp44 リガンドを発現する腫瘍細胞株と共培養し、細胞障害活性、CD107a アッセイ、サイトカイン産生能などを比較検討した。NKp44-CAR を遺伝子導入したT 細胞は、各種腫瘍細胞株に対していずれも強力なサイトカイン産生や細胞障害活性を発揮した。リガンドを発現しないヒトT 細胞(同種あるいは自家)に対しては細胞障害性を認めなかった。NKp44 ブロッキング抗体による前処理によってもNKp44 の特異性が確認された。さらに、NKp44 受容体においてはヒンジ部分も抗原認識に参与する可能性が指摘されており、NKp44 のオリジナルヒンジとCD8 ヒンジとを比較したところ、前者で細胞障害活性が高いことが判明した。



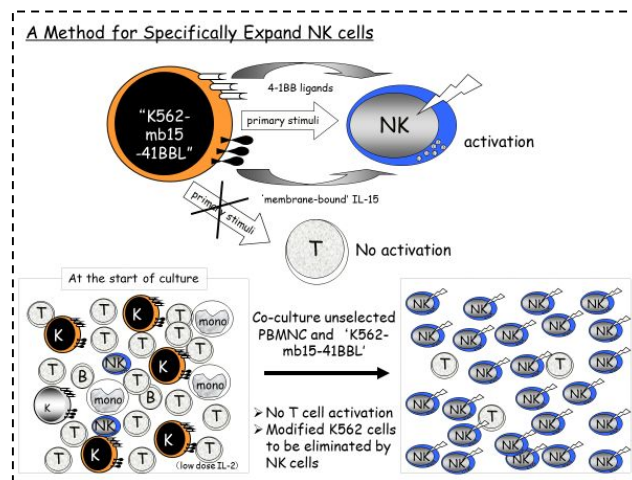
[5] NKp30-CAR の作成と機能評価

NKp44 の作成と同様の方法で、NKp30-CAR を発現した。NKp30 リガンドは調べた範囲では腫瘍細胞のごく一部に発現するのみだった。表面発現量がNKp44-CAR と同等であることを確認したうえで、NKp44-CAR と直接の比較をした。種々の細胞株に対してNKp44-CAR-T 細胞

胞が有意に強力な抗腫瘍活性を示した。また、NKp44-CART 細胞と、K562-mb15-41BBL 活性化ヒト NK 細胞と直接比較したところ、短時間の細胞障害活性は明らかに NK 細胞が高かったが、培養時間を延ばすとその効果は逆転した。NK 細胞は細胞障害後に高率にアポトーシスに陥るが、CAR-T 細胞ではたとえ第 1 世代 CAR であっても数回の recycle による多くの腫瘍細胞の殺傷が可能であるためと解釈された。

[6] NK 細胞体外増幅条件の改良

K562-mb15-41BBL を用いた NK 細胞の体外増幅では、従来の培養法に比べて安定的な培養が可能となったものの、それでも個人間あるいは個人内での培養効率の差が著しい点は他方と同様である。個人差が少ない T 細胞培養と大きく異なる点であり、また臨床応用上の大きなハードルである。オリジナルのプロトコールでは、K562-mb15-41BBL は使用前に 100Gy の放射線照射を行っている。照射や種々の epigenome modifier (脱メチル化剤、HDAC 阻害剤など) により NK 細胞の活性化受容体が認識するストレスリガンドの発現量が高まる可能性があると考えて、条件検討を行った。培養液(主として無血清培地)の種類、サイトカインの種類、Feeder cell line への照射量、照射後のインキュベーション時間などを比較検討した。初期培養中の E : T 比の最適化によっても増幅高率は向上し得た。最終的に 1 週毎に feeder cell を追加する系において最大の培養効率(3 週間の培養で 4 万倍を超える増幅)が得られた。



一方、新たな feeder cell line のための新規因子の探索は難航した。申請者の開発した膜結合型キメラサイトカインを模倣した膜結合型 IL-21 の有用性が他グループから報告されている (Denman CJ, et al. PLoS One 2012)。さらなる比較検討が必要である。

[7] 第 2 世代 NKp44-CAR の構造適正化

同様の手法で、構造の異なる種々の第 2 世代 CAR を作成した。4-1BB シグナルドメインあるいは CD28 シグナルドメインを挿入することにより第 2 世代化した新たな遺伝子を複数作成し、比較検討した。ヒト初代培養 T 細胞に遺伝子導入し、表面の CAR 発現、抗原刺激後の増幅能、腫瘍細胞に NKp44-CAR の最適な構造が決定された。抗原刺激後の増幅率で比較した場合、CD8 の膜貫通部位と 4-1BB のシグナルドメインを用いる場合が最も結果が良かった。腫瘍細胞株との長時間の共培養実験でも、カウンターパートである第 1 世代 CAR と比較して有意に強力な抗腫瘍効果を示すことが確認された。この CAR 遺伝子を使った遺伝子改変細胞療法は、白血病(骨髄性、T 細胞性、B 細胞性)や各種の肉腫や固形がんにも有効である可能性があり、広汎な対象疾患を有する CAR-T 療法の開発の基礎となり得る。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. **今井千速** . CAR-T 細胞療法 - 遺伝子改変 T 細胞を用いた新しいがん治療 . 小児科. 59(10): 1583-91, 2018
2. **今井千速** . がん免疫療法 : 最近話題の PD-1 抗体から CAR-T 療法まで . 新潟県小児科医学会会報. 60: 17-20, 2018
3. Miot C, Imai K, **Imai C**, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in 29 patients hemizygous for hypomorphic IKBKG / NEMO mutations. Blood.130: 1456-1467, 2017
4. Hosokai R, ..., **Imai C**. Donor Killer Immunoglobulin-Like Receptor Haplotype B/x Induces Severe Acute Graft-versus-Host Disease in the Presence of Human Leukocyte Antigen Mismatch in T Cell-Replete Hematopoietic Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 23(4): 606-611, 2017
5. Iwabuchi H, ..., **Imai C**. Successful treatment of histiocytic sarcoma with cladribine and high-dose cytosine arabinoside in a child. Int J Hematol. 2017, 106(2): 299-303.
6. **今井千速** . 白血病に対する新しい薬物・細胞治療 . 日本医師会雑誌 . 145(12): 2600-2604, 2017

7. **今井千速**. キメラ抗原受容体 (CAR): 人工受容体遺伝子を導入したリンパ球による新たながん治療. 新潟医学会雑誌. 131 (1): 7-10, 2017
8. Yoshida T, ..., **Imai C** (7 番目), et al. All-trans retinoic acid enhances cytotoxic effect of T cells with an anti-CD38 chimeric antigen receptor in acute myeloid leukemia. Clin Transl Immunology. 2016 Dec 9;5(12):e116.
9. Imamura T, ... , **Imai C** (4 番目) ,et al. Characterization of pediatric Philadelphia-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with kinase fusions in Japan. Blood Cancer J. 2016, 6:e419.
10. Sarashina T, ..., **Imai C**, Goto H. Hematopoietic stem cell transplantation for pediatric mature B-cell acute lymphoblastic leukemia with non-L3 morphology and MLL-AF9 gene fusion: three case reports and review of the literature. Int J Hematol. 104(1):139-43, 2016.

〔学会発表〕(計 20 件)

1. **今井千速**. 「小児造血器腫瘍における最新の話題」 九州・山口小児がんフォーラム 2019 2019 年 2 月 16 日 (福岡市)
2. Shin C, ..., **Imai C**. Development of novel chimeric antigen receptor targeting PD-1 ligands in Osteosarcoma. 50th Annual congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP), Nov 17th, 2018, Kyoto, Japan
3. Shin C, ..., **Imai C**. PD-1 ligands are upregulated after T-cell attack in childhood solid tumors and may become a candidate for CAR-T cell therapy. 第 60 回日本小児血液がん学会, 2018 年 11 月 15 日 (京都市)
4. Kasahara Y, ..., **Imai C**. Superior Activity of NKp44-CAR-T Cells in Comparison with Ex Vivo Expanded Activated NK cells or NKp30-CAR-T cells. 第 60 回日本小児血液がん学会. 2018 年 11 月 14 日 (京都市)
5. Shin C, ..., **Imai C**. Development of novel chimeric antigen receptor targeting PD-1 ligands in cancer cells. 第 80 回日本血液学会学術集会、2018 年 10 月 14 日 (大阪市)
6. 笠原靖史、..., **今井千速**. Development of CAR-T therapy using NKp44 ectodomain for antigen recognition. 第 10 回血液疾患免疫療法学会学術集会 2018 年 9 月 22 日 (東京都文京区)
7. **今井千速**. 「キメラ抗原受容体 (CAR) による遺伝子改変 T 細胞療法 -肉腫への応用に向けて」 第 91 回日本整形外科学会シンポジウム 2018 年 5 月 25 日 (神戸市)
8. **今井千速**. 「小児固形腫瘍に対する CAR-T 療法の開発」 14 回北関東小児がんセミナー 2018 年 5 月 19 日 (前橋市)
9. 笠原靖史、..., **今井千速**. NKp44 キメラ抗原受容体による新しいがん免疫治療の開発. 第 228 回日本小児科学会新潟地方会 2018 年 5 月 12 日 (新潟市)
10. **今井千速**. 「新潟県の小児在宅医療体制整備のために今、何が必要か：中核病院の立場から (小児専門医療施設の必要性等)」 平成 29 年度新潟県小児在宅医療後援会 2018 年 3 月 2 日 (新潟市)
11. Kasahara Y, ..., **Imai C**. Adoptive T cell immunotherapy against a wide range of malignancies by using chimeric antigen receptors with NK cell-like specificity (NKp44-CAR). 第 59 回日本小児血液がん学会 2017 年 11 月 10 日 (松山市)
12. **Imai C**, et al. Characteristics and Outcomes of Childhood ALL with ETV6-RUNX1: The CCLSG ALL 2004 Study. 第 59 回日本小児血液がん学会 2017 年 11 月 9 日 (松山市)
13. Kasahara Y, ..., **Imai C**. A novel chimeric antigen receptor endows T cells with NK cell-like specificity and attacks a wide range of hematological malignancies and cancers. The 22nd European Hematology Association Congress. June 23rd, 2017 (Madrid, Spain)
14. 笠原靖史、..., **今井千速**. キメラ抗原受容体開発への取り組み 免疫グロブリンの抗原結合能を利用する人工受容体：構造と機能変化. 第 32 回新潟血液免疫学研究会. 2017 年 2 月 24 日 (新潟市)
15. **今井千速**. 「新潟県における小児専門医療施設を考える：小児科医の立場から」 第 721 回新潟医学会シンポジウム. 2017 年 2 月 18 日 (新潟市中央区)
16. Kasahara Y, ..., **Imai C**. Genetic engineering of primary natural killer cells with human Interleukin-21 enhances their anti-leukemic capacity. 第 58 回日本小児血液がん学会 2016 年 12 月 16 日 (東京都品川区)
17. Kasahara Y, ..., **Imai C**. A Novel NKp44-Based Chimeric Antigen Receptor That Targets Multiple Types of Cancer. The 58th American Society of Hematology, Dec 4, 2016 (San Diego, CA, USA)
18. 笠原靖史、..., **今井千速**. Development of novel NKp44-based chimeric antigen receptors that target cancer cells. 第 78 回日本血液学会. 2016 年 10 月 13 日 (横浜市)

19. **今井千速** .「キメラ抗原受容体 (CAR) の開発: 白血病から固形がんへ」小児血液・がんセミナー in Chiba (特別講演) 2016年9月23日 (千葉市中央区)
20. **今井千速** .「キメラ抗原受容体 (CAR): 人工受容体遺伝子を導入したリンパ球による新たながん治療」第716回新潟医学会特別講演 2016年7月16日 (新潟市) 今井千速 .

〔図書〕(計 1 件)

1. **今井千速** . CQ3 小児 ALL の寛解後の標準的治療は何か .『小児白血病・リンパ腫の診療ガイドライン 2016 年版』(日本小児血液・がん学会編) 金原出版, 東京: 15-16, 2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: 「キメラ抗原受容体」
発明者: 今井千速、笠原靖史
権利者: 新潟大学
種類: 特許
番号: 特願 2016-182078
出願年: 2016 年
国内外の別: 国内

名称: 「キメラ抗原受容体」
発明者: 今井千速、笠原靖史
権利者: 新潟大学
種類: 特許
番号: 特願 2018-047242
出願年: 2018 年
国内外の別: 国内

取得状況 (計 1 件)

名称: Chimeric receptors with 4-1BB stimulatory signaling domain
発明者: Campana D and Imai C
権利者: St. Jude Children ' s Research Hospital
種類: United States Patent
番号: No. 9,605,049 B2
取得年月日: 2017 年 3 月 28 日
国内外の別: 国外

〔その他〕特になし

6 . 研究組織

(1) 研究分担者: なし

(2) 連携研究者

今村 勝 (MASARU IMAMURA)
新潟大学医歯学総合病院・講師
研究者番号: 80464006

高地 貴行 (Takayuki Takachi)
新潟大学医歯学総合病院・特任助教
研究者番号: 70444164

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。